

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

BEST AVAILABLE COPY

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



EP 04 / 0 9085

REC'D 23 SEP 2004

WIPO PCT

BEST AVAILABLE COPY

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen: 103 55 408.4

Anmeldetag: 25. November 2003

Anmelder/Inhaber: Aventis Behring GmbH,
35041 Marburg/DE

Bezeichnung: C1-INH als Medikament zur Therapie
von humanpathogenen Viren

IPC: C 07 K, C 12 Q

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 27. Mai 2004
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Wallner

5 AVENTIS BEHRING GMBH
ANR 8177007

2003/M019 (A79)
Dr. Pfe / vm

10 C1-INH als Medikament zur Therapie von humanpathogenen Viren

Der C1-Esterase-Inhibitor (C1-INH) aus Humanplasma ist ein Sialinsäure-haltiges Glykoprotein, das andere Glykoproteine und -lipide, die Komponenten oder auch Membranbausteine von Mikroorganismen viralen und bakteriellen Ursprungs sein können, binden kann. Diese Bindung vermag erfindungsgemäß das Eindringen bestimmter Viren in Zielzellen zu inhibieren.

Die Wechselwirkung zwischen HIV und C1-INH ist schon beschrieben und wird von den Autoren zur Abtrennung von HIV aus einer Flüssigkeit (EP 0 966 976 A1 / Centeon Pharma GmbH) bzw., mit einem speziell modifizierten C1-INH-Molekül, zur Blockierung der Infektiosität von HIV (EP 0 969 017 A1 / Centeon Pharma GmbH) verwendet.

Überraschend wurden nun Hinweise gefunden, dass der C1-INH mit den Sialinsäure-Gruppierungen seines beträchtlichen Kohlehydratanteiles, die wie ein multivalenter Rezeptor für virale Hämagglutinin-Membranbausteine von bspw. Orthomyxoviren (z.B. Influenza-A- und -B-Viren) oder Paramyxoviren (z.B. Parainfluenza-, Mumps- und Masern-Viren) fungieren, reagieren kann und damit in den Schleimhäuten zu einem früh wirkendenden System der Abwehr von Infektionserregern gehört. Denn das Hämagglutinin-Molekül besitzt in der distalen globulären Domäne eine Bindungsstelle, die Sialinsäuremoleküle auf der Oberfläche infizierbarer Zellen erkennt und somit auch C1-INH-ständige Sialinsäurereste binden kann. Dieser Baustein ist für die Lentiviren (Retroviren) HIV-1 und HIV-2 bisher nicht beschrieben; deshalb sollte die C1-INH-HIV-Wechselwirkung andere Gruppierungen involvieren.

5

Der C1-INH wird vorwiegend in der Leber, aber auch in Epithelzellen und Makrophagen synthetisiert. Seine Plasmakonzentration beträgt 25 mg/dl, der Kohlehydratanteil 35 %, davon 14 % Sialinsäure. Zusammen mit einem Peptidanteil von 65 % resultiert ein Molekulargewicht von 104.000 (Haupt H. et al., 1970, Eur. J Biochem 17:254).

10

Der hohe Kohlenhydratanteil bestimmt vor allem Vorkommen und Wechselwirkungen mit Lektinen. Das multifunktionelle Protein findet man in den Schleimhäuten des Atemtraktes als eine erste Barriere für infektiöse Agentien.

15

Funktionell gehört der C1-INH zur Klasse der Serinproteinase-Inhibitoren. Sein Wirkungsspektrum umfasst die Regulation der Kontaktfaktoren der Hämostase: F XI a, F XII a, F XII f und das damit assoziierte Plasmakallikrein. Zusätzlich kontrolliert der C1-INH über die Hemmung der C1-Esterase den Weg der klassischen Komplement-Aktivierung (Heimbürger N., 1975, Proteinase inhibitors of human plasma – their properties and control functions. In: Proteases and Biological Control; Ed. Reich E., et al., 367; Cold Spring Harbor Symp.; Heimbürger N., 1994, Haemostasologie 14 (1) : 1). Da es der einzige körpereigene Komplementinhibitor ist, kommt ihm klinisch eine große Bedeutung zu, zumal bekannt ist, dass mehrere foudroyant verlaufende Krankheitsprozesse über die vom C1-INH kontrollierten Aktivierungssysteme ablaufen. Hieraus resultiert ein Verbrauch des Inhibitors, der häufig nur durch seine Substitution ausgeglichen werden kann. Das gilt für das angioneurotische Syndrom (nach Quincke, 1882; heute Angioödem), das durch einen angeborenen Mangel an funktionellem C1-INH verursacht wird, und für eine Reihe anderer Indikationen, die in den letzten Jahren hinzugekommen sind. Auf diesen Bedarf hat sich die Plasma fraktionierende Industrie mit der Herstellung hoch gereinigter C1-INH-Konzentrate eingestellt. Daneben steht auch rekombinanter humaner C1-INH aus mehreren Quellen zur Verfügung (Davis A.E. et al., 1992 Natur Genetics: 1: 354); z.Z. enthält dieses Produkt jedoch keinen Kohlehydratanteil, der dem in Humanplasma vorkommenden Molekül gleicht, und

20

25

30

35

5 das deshalb bestimmte Funktionen des Kohlehydratanteils von Plasma-stämmigem C1-INH nicht besitzen kann.

Dem C1-INH kommt vor allem deswegen eine so breite therapeutische Bedeutung zu, weil er den wie auch immer ausgelösten Entzündungsprozeß reguliert und lokal
10 limitiert. Das gilt besonders für den Bereich der Schleimhäute. Die Kontaktfaktoren können empfindlich auf jede Veränderung der Endotheloberflächen, z.B. durch die Aktivierung von Haemostase, Fibrinolyse und des Komplementsystems reagieren. Unter anderem entstehen dabei vasoaktive Peptide vom Bradykinin-Typ, die den Gefäßtonus beeinflussen. Im Kapillarbereich kann dies zu einer Dilation und
15 erhöhten Permeabilität führen, die ein Ödem oder auch ein Capillary Leak-Syndrom verursachen kann (Eisele B. et al., 1994, „Die gelben Hefte“ Jg. XXXIV, Heft 4: 162). Wenn dieser Prozeß nicht frühzeitig vom C1-INH durch Neutralisation der beteiligten Proteinase begrenzt wird, kann er in Form einer generellen Entzündung auf die Organe übergreifen. Das erklärt die Anwendung von C1-INH bei so vielen
20 Syndromen wie z. B. dem Capillary Leak und Kreislaufchock (EPA 0586 909 A 2 / Behringwerke AG.), der Sepsis und dem septischen Schock [EP 0620406 B 1 / Behringwerke AG.) und im extrakorporalen Blutkreislauf (DE-A-4227762 / Behringwerke AG).

5 Neu ist, dass der C1-INH nicht nur Proteinase, die in Infektion und Entzündung involviert sind, inaktiviert sondern auch mit von HIV unterscheidbaren Viren mittels anderen als den dort involvierten Molekülbereichen wechselwirkt und diese potentiell neutralisiert. Dieser Reaktionsfähigkeit könnte bspw. bei akuten Mumps- oder Maserninfektionen eine besondere Bedeutung zukommen. C1-INH ist daher
30 geeignet, die Schwere und Folgen von akuten Masern- oder Mumpsinfektionen zu lindern bzw. zu verhindern. Die Neutralisation ist offensichtlich beim unveränderten, nativen C1-INH-Molekül gegenüber humanen Immundefizienzviren nicht der Fall (EP O 969 017 A 1 / Centeon Pharma GmbH), weshalb eine spezielle Modifizierung vorgeschlagen wurde.

5 Schließlich gibt es einen Hinweis, dass es im Schleim gesunder Individuen Epithelzellen-ständige Glykoproteine gibt, die „ähnlich wie Zellrezeptoren Viruspartikel binden und an der Infektion hindern“ (Lange W., Vogel G., E. Uphoff H., 1999; Influenza Virologie, Epidemiologie, Klinik, Therapie und Prophylaxe; Blackwell Wissenschafts-Verlag). Mit den Viruspartikeln sind Influenzaviren (IV) gemeint. Da in den Behringwerken viele Proteine aus Humanplasma erstmalig isoliert worden sind, haben wir versucht, das bzw. die Glykoproteine zu identifizieren.

15 Für die Modelluntersuchungen haben wir IV verwendet. Da wir nicht mit lebenden Viren arbeiten wollten, entschieden wir uns für eine breit verwendete Vakzine, die als ein chemisch inaktivierter Spalt- und Mischimpfstoff mit 45 µg Hämagglutinin in einem Applikationsvolumen von 0,5 ml deklariert ist (Begrivac®). Wir konnten in der IV-Suspension mit der Agargel-Diffusionstechnik nach Ouchterlony und präzipitierenden anti-IV-Antikörpern kein Immunogen nachweisen. Das gelang jedoch mit einer kleinen Modifikation (Abb. 1): das zentrale Loch der Agarplatte wurde zunächst mit der Vakzine gefüllt und 24 Stunden später mit einer C1-INH-Lösung, um die IV-Antigene aus ihren Wechselwirkungen in der Vakzine herauslösen und bestimmen zu können.

25 Hierfür wurden die kreisförmig um das zentrale Loch gelegenen Stanzlöcher separat mit gepooltem Humanplasma und 2 polyklonalen humanen Immunglobulin-Konzentraten (Beriglobin® P) beschickt, die Antikörper gegen IV enthielten. Alle zeigen, wahrscheinlich abhängig vom Antikörper-Titer, 2 mehr oder weniger scharfe Präzipitate. Die Vakzine enthält also mindestens 2 Antigen-30 Populationen, die beide C1-INH binden (in Abb 1 nicht sichtbar) und sich in der Molekulargewichts-abhängigen Diffusionsgeschwindigkeit unterscheiden. Der Nachweis der Antigene aus der Vakzine ist konzentrationsabhängig und beginnt mit 62,5 µg/ml C1-INH bei 90 µg/ml Hämagglutinin. Genauere Angaben lassen sich mit dieser Technik nicht machen. Die Immunpräzipitate im Agargel sind meistens so 35 fein, dass sie erst nach Anfärben mit Coomassie Brilliant Blue sichtbar sind.

5

In der Immunelektrophorese wandert der Spaltimpfstoff heterogen im β - bis $\alpha 2$ -Globulinbereich, ohne einen typischen Präzipitatbogen zu bilden (Abb. 2 a). Nach Zusatz von C1-INH im 20-fachen Überschuss konzentrieren sich die IV-Antigene im $\alpha 2$ -Globulinbereich mit einer Schleppe zum Auftragsort. Über den ganzen Bereich präzipitiert das Material auch mit Antikörpern gegen C1-INH und zwar in Form einer Erweiterung des sichelförmigen Präzipitats, das der C1-INH alleine bildet (Abb. 2 b).

10

15

Aus den Befunden folgt, dass der Spaltimpfstoff, bedingt durch die Spaltung und chemische Inaktivierung, aus Komponenten unterschiedlicher elektrophoretischer Beweglichkeit besteht, die alle an den C1-INH binden und offenbar den gleichen passenden Akzeptor besitzen. Die Hauptkomponente, die wahrscheinlich Hämagglutinine enthält, bildet Komplexe mit $\alpha 2$ -Globulinbeweglichkeit. Daneben sieht man mehrere höhermolekulare, langsamer wandernde Komplexe und Aggregate. Auffallend ist, dass die C1-INH-IV-Antigen-Komplexe mit Antikörpern gegen den C1-INH deutlich besser sichtbar werden als mit anti-IV-Antikörpern. Dieses Phänomen kann dadurch zustande kommen, dass der gegenüber IV potentiell multivalente C1-INH eine Vielzahl von endständigen Sialinsäuregruppen trägt, über die er IV und auch andere Hämagglutinin-haltige Viren binden und vielleicht sogar vernetzen kann, wobei dadurch von anti-IV-Antikörpern erkennbare Epitope blockiert werden könnten.

20

25

30

Überraschenderweise kann man mit der Immunelektrophorese im Humanplasma IV-Antigene nachweisen. In 4 unterschiedlichen von uns untersuchten Humanplasmapools fanden wir mit humanen anti-IV-Antikörpern ein punktförmiges, langsam diffundierendes Antigen im $\alpha 2$ -Globulinbereich (Abb. 3) und manchmal weiter anodisch noch ein zartes, sichelförmiges Präzipitat (in der Abb.3 nicht sichtbar). Die Herkunft der beiden IV-Antigene, die offensichtlich als Komplex mit C1-INH im Blut zirkulieren, ist unklar; entweder stammen sie von einer Influenza-

- 5 Infektion, oder sie sind das Ergebnis einer Vakzinierung. In jedem Fall können sie nach ihrer elektrophoretischen Beweglichkeit Prozessierungsprodukte der IV sein.

Nach Zugabe von Influenzaspaltimpfstoff zum gleichen Plasmapool erscheint ein großes farbintensives Präzipitat anodisch vom Auftragsort (Abb. 3 a, unten); es
10 kann in der Vakzine vorhandenen Antigenen zugeordnet werden, die zum Teil in ihrem ladungsabhängigen Diffusionsverhalten den im Plasma bereits vorhandenen IV-Antigenen entsprechen. Das ist noch besser in Immunelektrophoresen von den beiden Plasmapoolproben zu erkennen, die mit einem Antiserum gegen C1-INH entwickelt wurden (Abb. 3 b). Überall dort, wo in Abb. 3 a IV-Antigen liegt, findet
15 man auch C1-INH und zusätzlich natürlich die sichelförmigen Präzipitate des C1-INH, der nicht IV-Antigen gebunden hat. Auffällig ist, dass der C1-INH in dem mit Vakzine angereicherten Plasma vermindert ist; offenbar wird er von der Vakzine gebunden (Abb. 3 b unten).

- 20 Dafür spricht auch die für IV-C1-INH-Komplexe charakteristische hohe Farbintensität, die ihren Nachweis in hoher Verdünnung im Humanplasma überhaupt möglich macht.

Es ist durchaus denkbar, dass die C1-INH-IV-Komplexe auch mit anderen
25 Technologien nachgewiesen werden können: bspw. mit einer Sandwich-ELISA-Methode über spezifische, an einer geeigneten Matrix immobilisierte Fänger-Antikörper gegen eine der beiden Komponenten und mit einem markierten Zweitantikörper gegen die jeweils andere Komponente. Die verwendeten klassischen, relativ einfachen Präzipitationstechniken im Gel erwiesen sich aber als
30 ausreichend. Ergänzende Experimente (z.B. mit C1-INH, der zur Entfernung der Sialinsäurereste mit Neuraminidase behandelt worden ist) können den unterstellten Wechselwirkungsmechanismus überprüfen helfen.

Diagnostisch könnte der C1-INH-Hämagglutinin-Wechselwirkung eine potentielle
35 Bedeutung zukommen, weil der quantitative Nachweis von Viruspartikel- oder

- 5 Virusbestandteil-gebundenem C1-INH, bspw. auch extravasal auf Schleimhäuten, einem bestimmten Infektionsstatus entsprechen könnte.

Den Anstoß für unsere Untersuchungen gab die bereits erwähnte Beobachtung (von Lange, W. et al.; s.o.), dass es in der Schleimhaut Glykoproteine gibt, die eine

- 10 1. Barriere der Infektabwehr bilden; sie binden IV-Partikel und hemmen dadurch die Infektion.

Wir haben den C1-INH als eines der Glykoproteine identifiziert und können nach Untersuchungen an einer Vakzine bestätigen, dass er eine Bindungsfähigkeit für IV besitzt:

- 15 1. Aus einer IV-Vakzine lassen sich konzentrationsabhängig mit C1-INH IV-Antigene als Inhibitor-Komplexe unterschiedlicher Diffusionsfähigkeit mittels geeigneter Antikörper nachweisen (Abb. 1).

- 20 2. Im elektrischen Feld der Immunoelktrophorese wandert die Vakzine vom Auftragsort bis in den $\alpha 2$ -Globulinbereich. Dabei dissoziiert sie in viele Komponenten unterschiedlicher Beweglichkeit (Abb. 2). Nach Zusatz von C1-INH reichert sich das Material in einem typischen, mit anti-IV-Antikörpern erzeugbaren Präzipitat an. Die Wechselwirkungen der Misch- und Spaltvakzine mit C1-INH werden mit einem Antiserum gegen C1-INH sichtbar. Mit der dadurch erhöhten Nachweisempfindlichkeit erkennt man, dass auf dem ganzen Wanderungsweg C1-INH-IV-Antigen-Komplexe unterschiedlicher Beweglichkeit liegen müssen.

- 30 3. Im Plasma findet man, auch nach Zusatz der Vakzine, keine auffallenden Heterogenitäten. Die Komplexierung der IV-Komponenten durch C1-INH kann hierfür eine Erklärung sein (Abb. 3).

5 4. In 4 Pools von Humancitratplasma konnten wir jeweils einen Komplex aus
C1-INH und IV-Antigenen nachweisen. Er wandert im elektrischen Feld
schneller als die für Vergleichszwecke zugesetzte Vakzine. Wir haben
Hinweise dafür, dass es mehr solcher Komplexe gibt, die kleiner und
beweglicher als die Vakzine sind (s.o.), aber an der Nachweisgrenze liegen.
10 Alle Plasmen, in denen wir Komplexe aus IV und C1-INH fanden, enthielten
auch Antikörper gegen das Virus. Im isolierten System hergestellte
Komplexe aus IV und C1-INH lösten sich in Gegenwart von Calciumionen
nach Zugabe von einem polyklonalen IgG-Konzentrat, das Antikörper gegen
das IV enthielt, wieder auf. Bemerkenswert ist die vermutlich lange
15 Verweilzeit der C1-INH-IV-Komplexe im Blut. Eine Erklärung könnte die Art
der „Verpackung“ liefern, zu der sicher der C1-INH beiträgt. Sie dürfte von
Bedeutung sein: einmal für die Neutralisation der in Betracht kommenden
Viren, zum anderen für die Modulation der Immunantwort, zu der auch bspw.
die Herstellung einer Vakzine gehört, nach physiologischen Kriterien; denn
20 offenbar begleitet der C1-INH mindestens die Hämagglutinin-haltigen Viren
über den ganzen Zyklus von Infektion bis Immunabwehr. Wenn die alleinige
Diffusion das Trennprinzip darstellt, können nach Reaktion mit C1-INH, wie
in Abb.1 dokumentiert, mindestens 2 unterschiedlich diffundierende und für
geeignete Antikörper präzipitierbare Komplexe nachgewiesen werden.

5 Diese Eigenschaften machen den C1-INH zu einem wichtigen Bestandteil der
Abwehr von Mikroorganismen, wie z.B. von infektiösen Viren. Da das Prinzip
einfach, wirksam und erfolgversprechend ist und der C1-INH als hochgereinigtes
Protein für die intravenöse Anwendung z.V. steht, ist er eine Alternative oder
30 mindestens eine Ergänzung zu den gebräuchlichen Adjuvans-Vakzine-
Kombinationen; sie bietet sich vor allem für die Fälle an, in denen bekannt ist, dass
das Viruspartikel Hämagglutinin als Membranbestandteil enthält (Influenzaviren,
Paramyxoviren, Rotaviren und vielleicht auch SARS). Nach den Eigenschaften des
C1-INH ist eine extravasale Applikation über die Schleimhäute sinnvoll und
35 denkbar.

5 AVENTIS BEHRING GMBH
ANR 8177007

2003/M019 (A79)
Dr. Pfe / vm

10 **Ansprüche**

1. Verwendung von C1-INH zur Herstellung eines Medikaments für die
therapeutische Abwehr und Neutralisation von humanpathogenen Viren bzw. ihrer
toxischen Komponenten dadurch gekennzeichnet, dass die humanpathogenen
15 Viren Membranbestandteile mit Akzeptorfunktion tragen, vorzugsweise
Hämagglutinine.

2. Verwendung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Medikament
zur Linderung der Schwere und Folgen von akuten Masern- oder Mumpsinfektionen
20 eingesetzt wird bzw. diese verhindert.

3. Verwendung von C1-INH zur Modulation der Immunantwort, bspw. als
Bestandteil von Humanvakzinen, gegen humanpathogene infektiöse Agentien, die
Glykoprotein- bzw. Glykolipidbausteine enthaltende Membranen besitzen, speziell
5 Influenzaviren, Paramyxoviren und Rotaviren mit ihren Hämagglutinin-
Komponenten.

4. Verwendung von Nachweismethoden zu diagnostischen Zwecken dadurch
gekennzeichnet, dass die Wechselwirkung von C1-INH mit Hämagglutininen direkt
30 oder indirekt genutzt wird.

5. Verwendung von C1-INH bzw. von Teilstrukturen des C1-INH zur Abtrennung
von Viren mit Membranbestandteilen als Akzeptoren, wie z.B. Hämagglutininen.

5 Abbildungen

Abb. 1 Agargeldiffusionstest nach Ouchterlony Stanzlöcher

1. Mitte: IV-Vakzine (90 µg/ml und nach 24 Std.
C1-INH-Lösung (125 µg/ml)

10 im Halbkreis von links:

Gepooltes Humancitratplasma

Anti-C1-INH-Serum

Immunoglobulin-Konzentrat (Charge 1)

Immunoglobulin-Konzentrat (Charge 2)

15

Abb. 2 Immunoelktrophorese in Agarose

a) Rille: Immunglobulin-Konzentrat (Charge 1)

b) Rille: Anti-C1-INH Serum

1. IV-Vakzine (5 µg),

20 2. IV-Vakzine (5 µg) plus C1-INH (100 µg),

3. C1-INH (100 µg)

Auftragsvolumen 10 µl, Diffusionszeit 17 h

Abb. 3 Immunoelktrophorese in Agarose

a) Rille: Immunglobulin-Konzentrat

b) Rille: Anti-C1-INH Serum

1. Gepooltes Humancitratplasma

2. 2,5 µg IV-Vakzine in 50 µl gepooltem Humancitratplasma

Auftragsvolumen 10 µl, Diffusionszeit 17 h

30

AVENTIS BEHRING GMBH
ANR 8177007

2003/M019 (A79)
Dr. Pfe / vm

Zusammenfassung:

Die Verwendung von C1-INH zur Therapie von Viren wird beschrieben, deren Membranbestandteile Akzeptorfunktionen besitzen, vorzugsweise Hämagglutinin sind. Daneben kann C1-INH zu diagnostischen Zwecken oder zur Reinigung geeigneter Viren genutzt werden.

1/2

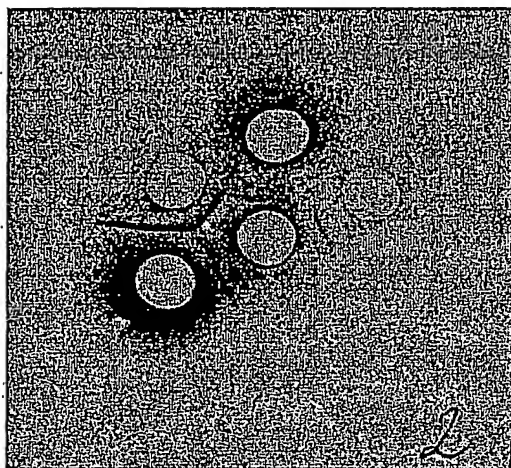


Fig.1

2/2

Fig.2a

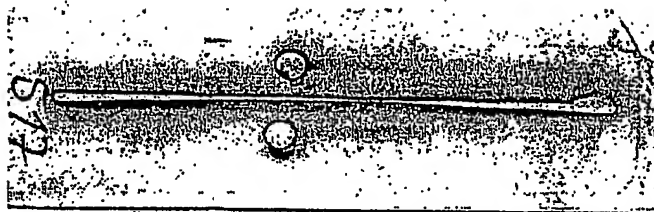


Fig.2b

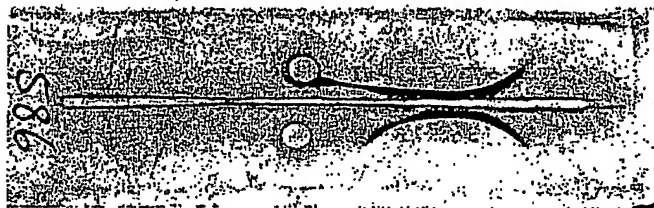


Fig.3a

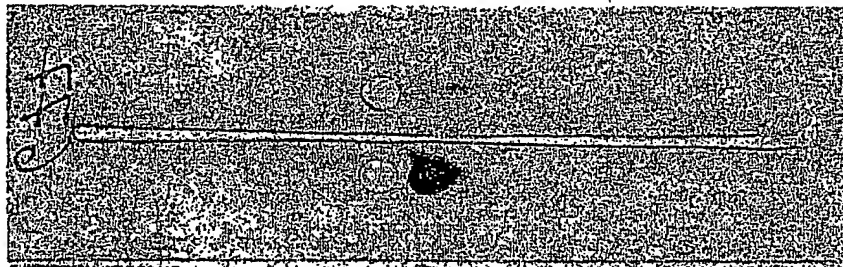
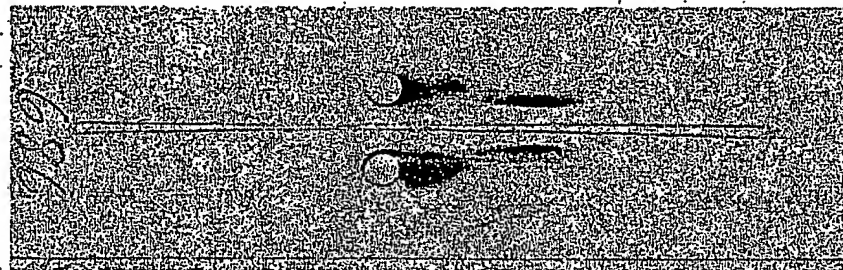


Fig.3b



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☒ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☒ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.